

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/011437

International filing date: 22 June 2005 (22.06.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-184678
Filing date: 23 June 2004 (23.06.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 22 July 2005 (22.07.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

29.06.2005

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 6 月 2 3 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 1 8 4 6 7 8

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

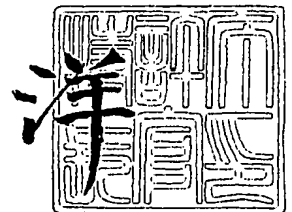
J P 2 0 0 4 - 1 8 4 6 7 8

出 願 人
Applicant(s): ダイソー株式会社

2 0 0 5 年 6 月 7 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



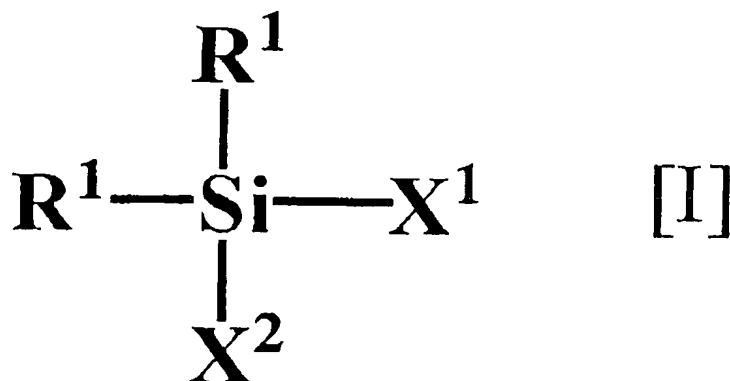
【書類名】 特許願
【整理番号】 P16-1945
【提出日】 平成16年 6月23日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 G01N 30/48
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府大阪市西区江戸堀 1 丁目 1 0 番 8 号 ダイソー株式会社内
 【氏名】 中島 雄一
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府大阪市西区江戸堀 1 丁目 1 0 番 8 号 ダイソー株式会社内
 【氏名】 浦野 武
【特許出願人】
 【識別番号】 000108993
 【住所又は居所】 大阪府大阪市西区江戸堀 1 丁目 1 0 番 8 号
 【氏名又は名称】 ダイソー株式会社
 【代表者】 佐藤 存
 【電話番号】 06-6409-1390
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 005474
 【納付金額】 16,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

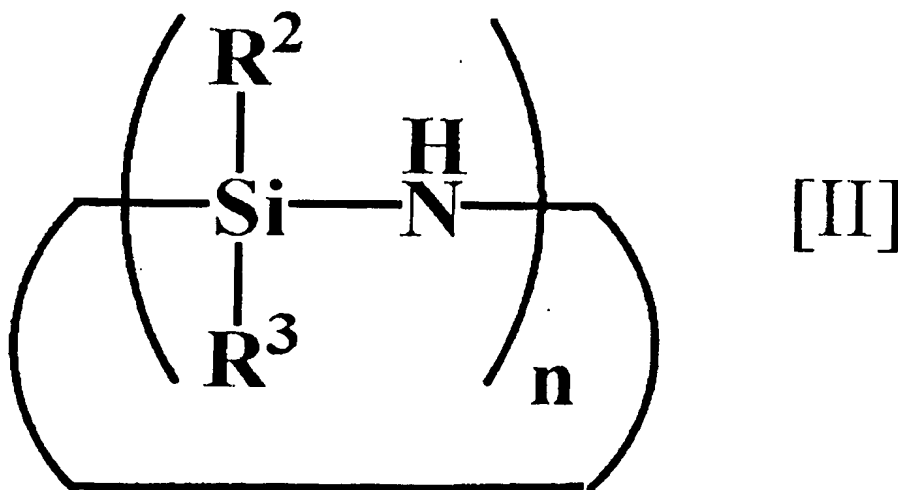
式 [I] で表される二官能性シラン化合物による化学修飾を施したシリカゲルに、式 [II] で表される二官能性環状シラザンを用いてエンドキャップ反応を行うことを特徴とする液体クロマトグラフィー用充填剤の製造法。

【化 1】



[式中、 X^1 および X^2 は水素原子、同一または異なるハロゲン原子もしくは炭素数 1～4 のアルコキシ基であり、 R^1 はアルキル基またはアリール基である。]

【化 2】



[式中、 R^2 および R^3 は同一または異なり、炭素数 1～4 のアルキル基である。また、 n は環を形成するユニットの係数で、2～10 の整数である。]

【請求項 2】

式 [I] 中の R^1 としてのアルキル基は末端にアリール基やアミノ基、シアノ基、ニトロ基を有するか、または非末端にアミド基またはカーバメート基、カーバマイド基、エステル基、カーボネート基を有する請求項 1 に記載の液体クロマトグラフィー用充填剤の製造法。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の方法により製造された液体クロマトグラフィー用充填剤。

【請求項 4】

請求項 3 に記載される液体クロマトグラフィー用充填剤が充填された液体クロマトグラフィー用カラム。

【請求項 5】

請求項 4 に記載される液体クロマトグラフィー用カラムを用いた化合物の分析方法または分取方法。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の化合物が生体試料に含まれるペプチドまたはタンパク質である、請求項 5 に記載の化合物の分析方法または分取方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】高耐久性液体クロマトグラフィー用充填剤

【技術分野】

【0001】

本発明は、液体クロマトグラフィー用充填剤の製造法に関するものである。

【0002】

液体クロマトグラフィーは医薬品や食品、天然化合物などの分離分析の手段として幅広い分野で使用されている。通常、液体クロマトグラフィー用充填剤には優れた機械強度、良い分離性能などを特徴とする多孔性シリカゲルの表面をシラン化合物で化学修飾したものが多く用いられる。表面修飾シリカゲルとしては、表面のシラノール基に化学結合によりオクタデシル基を導入したもの（ODS）が最も一般的であるが、導入基がオクチル基、ブチル基、メチル基などであるものも知られている。また、アルキル基は末端にフェニル基やアミノ基、シアノ基、ニトロ基などの官能基を有する場合もある。

【0003】

液体クロマトグラフィーによる化合物の分析および分取においてはその分離条件として酸性の移動相やアルカリ性の移動相を用いることが多い。特に、ペプチド、タンパク質などを含む生体試料を分析および分取の対象とした場合は酸による加水分解のための修飾基の脱離やアルカリによるシリカゲルの溶解等の問題がある。すなわち長寿命かつ高耐久性シリカゲルが要求される。

【背景技術】

【0004】

従来の高耐久性シリカゲルの製造法としては、特許文献1にはシリカゲル表面にペルヒドロキシポリシラザンのようなポリシラザンを用いてオープンで焼成することによりセラミックスのコーティングを施した後に修飾剤シラン化合物を化学結合させる方法が記載され、特許文献2にはヒドロシリル基を有するシリコン化合物をシリカゲル表面で重合させてシリコンポリマーを形成させる方法が記載され、特許文献3には修飾剤のシラン化合物として、その構造内にオクタデシルジエーテルブチルクロロシランやオクチルジイソプロピルクロロシランのような立体保護基を有する一官能性シランを用いる方法が記載されている。

【0005】

しかし、特許文献1のセラミックス、特許文献2のポリマーによる表面コーティングは、シリカゲルの特性を失う恐れがあり、特許文献3の立体保護は液体クロマトグラフィー用充填剤としての選択性を大きく変えることになる。

【特許文献1】特開平10-206407号公報。

【特許文献2】特開2003-149219号公報。

【特許文献3】特開昭63-137750号公報。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は上記のような実情から耐酸性及び耐アルカリ性に優れ、高耐久性液体クロマトグラフィー用充填剤を提供することを課題とするものである。

【課題を解決するための手段】

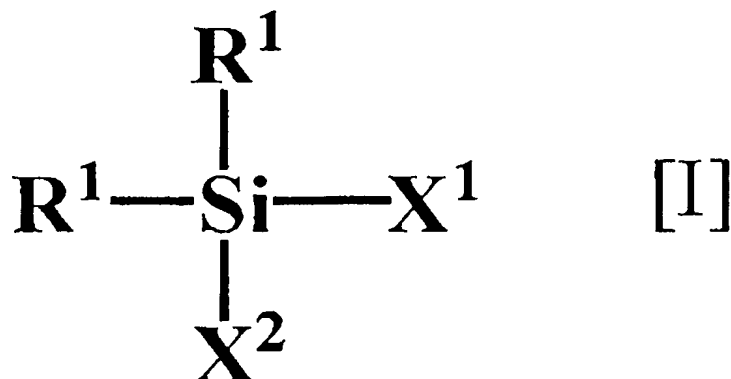
【0007】

本発明者は、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、シリカゲルに特定の構造を有するシラン化合物を用いて表面修飾を行い、さらに特定の構造を有する二官能性環状シラザン化合物を用いたエンドキャップ反応と組み合わせることにより、シリカゲルの特性を失うことなく、液体クロマトグラフィー用充填剤としての選択性を大きく変えることなく、極めて耐酸性、耐アルカリ性に優れた新規高耐久性液体クロマトグラフィー用充填剤の製造法を確立するに至った。

【0008】

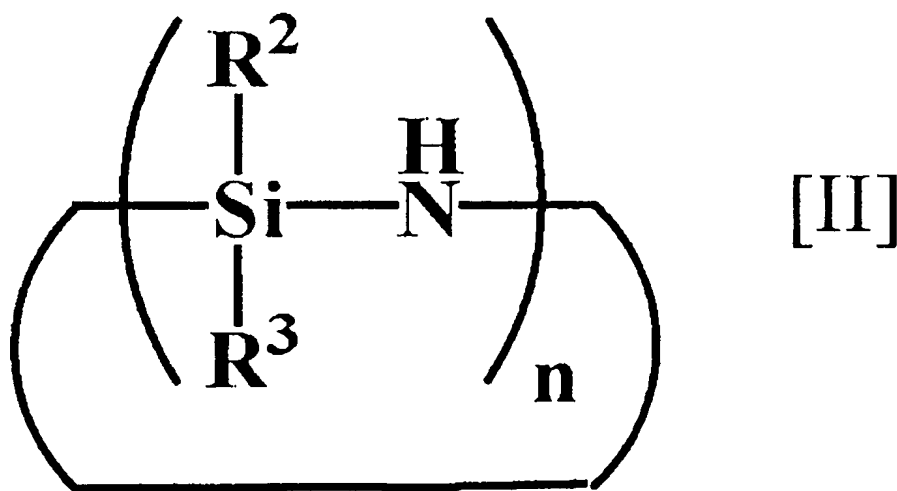
すなわち、本発明は式 [I] で表される二官能性シラン化合物による化学修飾を施したシリカゲルに、式 [II] で表される二官能性環状シラザンを用いてエンドキャップ反応を行うことを特徴とする液体クロマトグラフィー用充填剤の製造法である。

【化 1】



[式中、 X^1 および X^2 は水素原子、同一または異なるハロゲン原子もしくは炭素数 1～4 のアルコキシ基であり、 R^1 はアルキル基またはアリール基である。]

【化 2】



[式中、 R^2 および R^3 は同一または異なり、炭素数 1～4 のアルキル基である。また、 n は環を形成するユニットの係数で、2～10 の整数である。]

更に、本発明は本発明により得られた液体クロマトグラフィー用充填剤を用いた液体クロマトグラフィー用カラム、そのカラムを用いた分析方法または分取方法、特に生体試料に含まれるペプチドまたはタンパク質の分析または分取方法を提供する。

【0009】

式 [I] 中の R^1 としてのアルキル基は、直鎖状アルキル基、分枝状アルキル基、環状アルキル基であってもよい。 R^1 がアルキル基の場合、炭素数は特に限定しないが、好ましくは 1～30 で、より好ましくは 1～8 である。また、 R^1 としてのアリール基はフェニル基、トリル基、ナフチル基などであってもよい。

【0010】

式 [I] 中の R^1 としてのアルキル基は末端にアリール基やアミノ基 ($-\text{NH}_2$)、シア

ノ基 ($-\text{CN}$)、ニトロ基 ($-\text{NO}_2$) を有するか、または非末端にアミド基 ($-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$) またはカーバメート基 ($-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$)、カーバマイド基 ($-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$)、エステル基 ($-\text{O}-\text{C}(\text{O})-$)、カーボネート基 ($-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{O}-$) を有していてもよい。

【0011】

原料シリカゲルは、粒子径が通常 $1 \sim 1000 \mu\text{m}$ 、好ましくは $2 \sim 200 \mu\text{m}$ であり、細孔径が通常 $10 \sim 10000$ オングストローム、好ましくは $50 \sim 3000$ オングストロームであり、表面積が通常 $1 \sim 1000 \text{m}^2/\text{g}$ 、好ましくは $5 \sim 600 \text{m}^2/\text{g}$ である多孔性シリカゲルである。高い分離性能を得るためには原料シリカゲルとしては高純度かつ球形のものが好ましい。

【0012】

式 [I] で表される二官能性シラン化合物は、水素原子、ハロゲン原子またはアルコキシル基を有するアルキルシランまたはアリールシランである。具体的には、ジメチルジクロロシラン、ジメチルジメトキシシラン、ジメチルジエトキシシラン、ジエチルジクロロシラン、ジエチルジメトキシシラン、ジエチルジエトキシシラン、ジ- n -プロピルジクロロシラン、ジ- n -プロピルジメトキシシラン、ジイソプロピルジクロロシラン、ジイソプロピルジメトキシシラン、ジ- n -ブチルジクロロシラン、ジ- n -ブチルジメトキシシラン、ジイソブチルジクロロシラン、ジイソブチルジメトキシシラン、ジ- t -ブチルジクロロシラン、ジ- t -ブチルジメトキシシラン、ジ- n -ペンチルジクロロシラン、ジ- n -ペンチルジメトキシシラン、ジシクロペンチルジクロロシラン、ジシクロペンチルジメトキシシラン、ジ- n -ヘキシルジクロロシラン、ジ- n -ヘキシルジメトキシシラン、ジシクロヘキシルジクロロシラン、ジシクロヘキシルジメトキシシラン、ジ- n -ヘプチルジクロロシラン、ジ- n -ヘプチルジメトキシシラン、ジ- n -オクチルジクロロシラン、ジ- n -オクチルジメトキシシラン、ジフェニルジクロロシラン、ジフェニルジメトキシシラン、ジメチルジクロロシラン、ジメチルジメトキシシラン、ジ- $(p\text{-トリル})$ -ジクロロシラン、ジビニルジクロロシラン、ジアリルジクロロシラン、ビス(3-シアノプロピル)ジクロロシラン、ビス(3-シアノプロピル)ジメトキシシランなどが例示できる。

【0013】

本発明では、種々の検討を行った結果、式 [I] にて示される二官能性シラン化合物を用いて化学修飾したものが、従来の一官能性シラン化合物を用いて化学修飾したものと比較して、その耐久性の向上において非常に効果的であることを見出した。

【0014】

化学修飾反応は、公知の方法および条件で行うことができ、シリカゲルと化学修飾剤としてのシラン化合物 [I] を溶媒中で加温して反応を行う。すなわち、反応温度としては、 $60 \sim 200^\circ\text{C}$ 、好ましくは $100 \sim 160^\circ\text{C}$ であり、液相中で行う。溶媒としては、特に限定しないが、アルキルシランとは反応せずかつ反応温度下で安定であるベンゼン、トルエン、キシレン、メシチレンなどの芳香族炭化水素、ジクロロベンゼンなどの置換芳香族化合物が好適である。反応圧は通常大気圧であるが、 $0.15 \sim 0.49 \text{MPa}$ の加圧条件下で行ってもよい。反応時間は $0.5 \sim 20$ 時間、好ましくは $3 \sim 10$ 時間である。二官能性シラン化合物の使用量は、シラン/シリカゲルの重量比にして、 $0.01 \sim 1$ で、好ましくは $0.05 \sim 1$ である。ピリジン、イミダゾールのような塩基性化合物を添加することが好ましい。

【0015】

二官能性シラン化合物は、一官能性のものに比べると、反応できるサイトが多く、より反応性が高く、また三官能性のものに比べると、副反応が少ないといった利点がある。

【0016】

また、式 [I] で示される二本の主鎖を有する二官能性シラン化合物を用いた場合は、一本の主鎖を有する二官能性のアルキルシラン化合物 (例えば、オクタデシルメチルジクロロシラン、 n -オクチルメチルジクロロシランなど) を用いた場合とは異なり、シリカ

ゲルの単位面積あたりの主鎖となるアルキル基の密度は増大し、疎水力や分離能の向上、さらには耐久性の向上に有利である。

【0017】

化学修飾反応後の反応液をそのまま次のエンドキャッピング反応に用いてもよいが、化学修飾反応液から固形分を取り出してこれを洗浄乾燥してからエンドキャッピング反応に用いてもよい。

【0018】

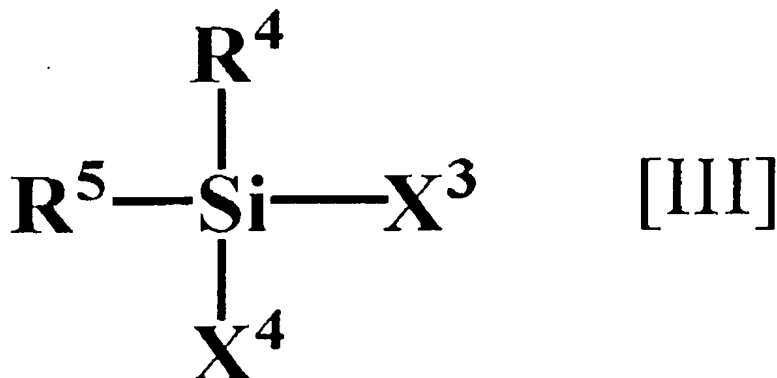
化学修飾反応後の反応液に引き続きエンドキャッピング剤を仕込んで反応させてもよいが、化学修飾反応終了後に、未反応の二官能性シラン化合物を加水分解させる場合もある。

【0019】

式 [II] で表されるエンドキャッピング剤は二官能性環状シラザンであり、好ましくは 1, 1, 3, 3, 5, 5-ヘキサメチルシクロトリシラザン、1, 1, 3, 3, 5, 5, 7, 7-オクタメチルシクロテトラシラザン、1, 1, 3, 3, 5, 5, 7, 7, 9, 9-デカメチルシクロペンタシラザン、1, 1, 3, 3, 5, 5, 7, 7, 9, 9, 11, 11-ドデカメチルシクロヘキサシラザン、1, 1, 3, 3, 5, 5-ヘキサエチルシクロトリシラザン、1, 1, 3, 3, 5, 5, 7, 7-オクタエチルシクロテトラシラザン、1, 1, 3, 3, 5, 5, 7, 7, 9, 9-デカエチルシクロペンタシラザン、1, 1, 3, 3, 5, 5, 7, 7, 9, 9, 11, 11-ドデカエチルシクロヘキサシラザンなどが例示される。これらは単独で用いても2種以上の混合物で用いてもよい。エンドキャッピング剤 [II] を式 [III] で表される二官能性シラン化合物（例えば、ジメチルジクロシラン、ジメチルジメトキシシランなど）と混合して用いてもよい。

【0020】

【化3】



[式中、 X^3 および X^4 は、同一または異なり、水素原子、ハロゲン原子または炭素数 1～4 のアルコキシ基、 R^4 および R^5 は、同一または異なり、炭素数 1～4 のアルキル基をそれぞれ意味する。]

【0021】

本発明では、種々の検討を行った結果、エンドキャッピングには、式 [II] にて示される二官能性環状シラザンを用いることで、従来の一官能性エンドキャッピング剤としてのトリメチルクロロシランやヘキサメチルジシラザンを用いた場合よりも、得られる修飾シリカゲルの耐久性が格段に向上することを見出した。

【0022】

エンドキャッピング反応は、公知の方法および条件下で行うことができ、化学修飾したシリカゲルとエンドキャッピング剤を溶媒中で加温して反応を行う。すなわち、反応温度としては、60～200℃、好ましくは100～160℃であり、液相中で行う。溶媒としては、特に限定しないが、エンドキャッピング剤とは反応せずかつ反応温度下で安定で

あるベンゼン、トルエン、キシレン、メシチレンなどの芳香族炭化水素、ジクロロベンゼンなどの置換芳香族化合物が好適である。反応圧は通常大気圧であるが、0.15~0.49 MPa の加圧条件下で行ってもよい。反応時間は0.5~20時間、好ましくは3~10時間である。エンドキャッピング剤の使用量は、エンドキャッピング剤/化学修飾シリカゲルの重量比で通常0.01~10で、好ましくは0.05~1である。ピリジン、イミダゾールのような塩基性化合物を反応液に添加することが好ましい。反応後、固液分離を行い、分離した固形分を十分にメタノールで洗浄し、乾燥して液体クロマトグラフィー用充填剤を得る。

【発明の効果】

【0023】

本発明によれば、200℃以下という比較的温和な温度で、したがって簡易な反応設備でかつ低コスト、短い製造工程で、高耐久性液体クロマトグラフィー用充填剤を製造することができる。

【0024】

本発明による液体クロマトグラフィー用充填剤は、シリカゲルの特性を失うことなく、液体クロマトグラフィー用充填剤としての選択性を変えことなく、耐酸性および耐アルカリ性が高く、長寿命である。特に、ペプチド、タンパク質などを含む生体試料の分析および分取に適している。

【発明を実施するための最良の形態】

【0025】

以下、本発明の実施例を幾つか挙げ、本発明を具体的に説明する。ただし、これら実施例は本発明を限定するものではない。比較として従来の一官能性シラン化合物および従来の一官能性エンドキャッピング剤を用いた例を挙げる。その耐酸性比較試験と耐アルカリ性比較試験、タンパク質の分離比較試験を行った。

【0026】

実施例 1

ダイソーゲル SP-300-10P (球形高純度シリカゲル、平均粒子径 $10\ \mu\text{m}$ 、細孔径 $300\ \text{\AA}$ 、表面積 $100\ \text{m}^2/\text{g}$) $20\ \text{g}$ を $150\ \text{ml}$ トルエン中で共沸脱水した後、 n -ブチルジメチルクロロシラン $3.3\ \text{g}$ とピリジン $2.4\ \text{g}$ を加え、加熱して5時間還流させた。引き続きエンドキャッピング剤として、1, 1, 3, 3, 5, 5-ヘキサメチルシクロトリシラザン $0.8\ \text{g}$ を加えて、5時間還流させてエンドキャップ反応を完了させ、室温まで冷却した後、ろ過、メタノールによる洗浄、乾燥して液体クロマトグラフィー用充填剤 $20\ \text{g}$ を得た。

【0027】

比較例 1

ダイソーゲル SP-300-10P の $20\ \text{g}$ を $150\ \text{ml}$ トルエン中で共沸脱水した後、 n -ブチルジメチルクロロシラン $2.3\ \text{g}$ とピリジン $1.2\ \text{g}$ を加え、加熱して5時間還流させた。引き続きエンドキャッピング剤として、トリメチルクロロシラン $2.0\ \text{g}$ 、ピリジン $1.8\ \text{g}$ を加えて、5時間還流させてエンドキャップ反応を完了させ、室温まで冷却した後、ろ過、メタノールによる洗浄、乾燥して液体クロマトグラフィー用充填剤 $20\ \text{g}$ を得た。

【0028】

比較例 2

ダイソーゲル SP-300-10P の $20\ \text{g}$ を $150\ \text{ml}$ トルエン中で共沸脱水した後、 n -ブチルジメチルクロロシラン $2.3\ \text{g}$ とピリジン $1.2\ \text{g}$ を加え、加熱して5時間還流させた。引き続きエンドキャッピング剤として、1, 1, 3, 3, 5, 5-ヘキサメチルシクロトリシラザン $2.0\ \text{g}$ を加えて、5時間還流させてエンドキャップ反応を完了させ、室温まで冷却した後、ろ過、メタノールによる洗浄、乾燥して液体クロマトグラフィー用充填剤 $20\ \text{g}$ を得た。

【0029】

比較例 3

ダイソーゲル SP-300-10P の 20 g を 150 ml トルエン中で共沸脱水した後、ジ-n-ブチルジクロロシラン 3.3 g とピリジン 2.4 g を加え、加熱して 5 時間還流させた。引き続きエンドキャッピング剤として、トリメチルクロロシラン 2.0 g、ピリジン 1.8 g を加えて、5 時間還流させてエンドキャップ反応を完了させ、室温まで冷却した後、ろ過、メタノールによる洗浄、乾燥して液体クロマトグラフィー用充填剤 20 g を得た。

【0030】

評価試験

1) 耐酸性試験

実施例 1 および比較例 1～3 で得られた液体クロマトグラフィー用充填剤について、それぞれを内径 6.0 mm、長さ 250 mm のステンレスカラムにスラリー法により充填した。酸性移動相の通液前後についてそれぞれ液体クロマトグラフィー評価試験により標準サンプルとしてナフタレンを用いて保持係数を求めた。また充填剤としての修飾シリカゲルの炭素含有量についても元素分析測定を行った。その結果から酸通液による保持係数の維持率および炭素含有率（修飾シリカゲル 1 グラム当たりの炭素重量）の維持率を算出し、その結果を表 1 に示す。カラムに酸性の移動相を通液することにより、修飾シリカゲルが酸により加水分解されて修飾基の脱離が起こり、化合物の保持係数が低下する。表 1 からわかるように、実施例 1 のように化学修飾剤に式 [I] に示す二官能性シラン化合物とエンドキャッピング剤に式 [II] に示す二官能性環状シラザンの両方を用いると、酸通液後に最も高い保持係数および炭素含有率の維持率が得られた。一方、比較例 1～3 のように、化学修飾剤もしくはエンドキャッピング剤に従来の一官能性シラン化合物を用いると、耐酸性に及ぼす効果は十分でなく、実施例 1 に比べて低い維持率の値となった。

【表 1】

表 1. 耐酸性試験結果の比較

	実施例 1	比較例 1	比較例 2	比較例 3
化学修飾シラン化合物	ジ-n-ブチルジクロロシラン	n-ブチルジメチルクロロシラン	n-ブチルジメチルクロロシラン	ジ-n-ブチルジクロロシラン
エンドキャッピング剤	1, 1, 3, 3, 5, 5-ヘキサメチルシクロトリシラザン	トリメチルクロロシラン	1, 1, 3, 3, 5, 5-ヘキサメチルシクロトリシラザン	トリメチルクロロシラン
酸通液による保持係数の維持率 (%)	96	7	56	89
酸通液による炭素含有率の維持率 (%)	96	26	69	95

【0031】

液体クロマトグラフィー評価試験

移動相：メタノール／水＝50／50（体積比）

流速: 1.7 ml/min

温度: 40℃

検出器: UV 254 nm

標準サンプル:

1) ウラシル (0.3 mg/ml)

2) ナフタレン (1.8 mg/ml)

インジェクション: 1.5 μ l

【0032】

保持係数の算出

化合物ウラシルの保持時間を t_1 とする。

化合物ナフタレンの保持時間を t_2 とする。

ナフタレンの保持係数を k とする。

k は以下の計算式により定義され、算出される。

$$k = (t_2 - t_1) / t_1$$

【0033】

酸性移動相の通液条件

移動相: アセトニトリル / 1% トリフルオロ酢酸水溶液 ($pH = 1$) = 10 / 90 (体積比)

流速: 0.9 ml/min

温度: 70℃

通液時間: 15 時間

【0034】

酸通液によるナフタレンの保持係数と炭素含有率の維持率の算出

維持率 (%) = 酸通液後の値 / 酸通液前の値 $\times 100\%$

【0035】

2) 耐アルカリ性試験

実施例 1 および比較例 1 ~ 3 で得られた液体クロマトグラフィー用充填剤について、それぞれを内径 6 mm、長さ 250 mm のステンレスカラムにスラリー法により充填した。アルカリ性移動相を通液して、カラムからの溶離液を全量回収し、回収液の元素分析により Si 溶出濃度を測定した。その結果を表 2 に示す。カラムにアルカリ性の移動相を通液することにより、カラム内の母体シリカゲルの溶解が起こる。表 2 からわかるように、実施例 1 のように化学修飾剤に式 [I] に示す二官能性シラン化合物とエンドキャッピング剤に式 [II] に示す二官能性環状シラザンの両方を用いると、アルカリ通液による Si 溶出濃度は最も小さく、すなわち耐アルカリ性は最も高い。一方、比較例 1 ~ 3 のように、化学修飾剤もしくはエンドキャッピング剤に従来の一官能性シラン化合物を用いると、耐アルカリ性に及ぼす効果は十分でなく、実施例 1 に比べてより高い Si 溶出濃度となった。

【表 2】

表 2. 耐アルカリ性試験結果の比較

	実施例 1	比較例 1	比較例 2	比較例 3
化学修飾シラン化合物	ジ-n-ブチルジクロロシラン	n-ブチルジメチルクロロシラン	n-ブチルジメチルクロロシラン	ジ-n-ブチルジクロロシラン
エンドキャッピング剤	1, 1, 3, 3, 5, 5-ヘキサメチルシクロトリシラザン	トリメチルクロロシラン	1, 1, 3, 3, 5, 5-ヘキサメチルシクロトリシラザン	トリメチルクロロシラン
アルカリ通液による溶出する Si 元素濃度 (ppm)	1 2	2 2 3	1 3 4	2 3

【0036】

アルカリ性移動相の通液条件

移動相: アセトニトリル/0.01N 水酸化ナトリウム水溶液 (pH=12)=10/90 (体積比)

流速: 1.7 ml/min

温度: 40℃

通液時間: 5 時間

【0037】

Si 溶出濃度測定

誘電結合プラズマ発光分析法 (ICP) を用いて測定を行った。

【0038】

3) タンパク質分離試験

実施例 1 および比較例 1 で得られた液体クロマトグラフィー用充填剤について、それぞれを内径 6 mm、長さ 250 mm のステンレスカラムにスラリー法により充填した。代表的なタンパク質の混合物を標準サンプルに用いて液体クロマトグラフィー評価試験を行った。実施例 1 および比較例 1 のそれぞれの充填剤の液体クロマトグラフィー用充填剤のタンパク質分離試験の液体クロマトグラフィーチャートを図 1 および図 2 にそれぞれ示す。実施例 1 で得られた、すなわち式 [I] に示す二官能性シラン化合物とエンドキャッピング剤に式 [II] に示す二官能性環状シラザンの両方を用いて調製される液体クロマトグラフィー用充填剤は比較例 1 で得られた、すなわち化学修飾剤とエンドキャッピング剤に従来の一官能性シラン化合物を用いて調製される液体クロマトグラフィー用充填剤と比較して、タンパク質の選択性およびその溶出順が変化することはない、むしろ従来では分離できなかった微量不純物 (図 1 参照) の分離も可能になり、より高い分離性能を有している。

【0039】

液体クロマトグラフィーの操作条件

移動相

A 液) アセトニトリル/水/トリフルオロ酢酸=20/80/0.1 (体積比)

B 液) アセトニトリル/水/トリフルオロ酢酸=60/40/0.1 (体積比)

0～25分 A液からB液への直線グラジエント

25～35分 B液100%

流速: 1.7 ml/min

カラム温度: 35℃

検出器: UV220nm

標準サンプル: 1)～6) の混合物

1) リボヌクレアーゼ A (2.0 mg/ml)

2) チトクロム C (1.5 mg/ml)

3) リゾチーム (1.5 mg/ml)

4) ウシ血清アルブミン (4.0 mg/ml)

5) ミオグロビン (2.0 mg/ml)

6) オバルブミン (5.0 mg/ml)

インジェクション: 10 μ l

【図面の簡単な説明】

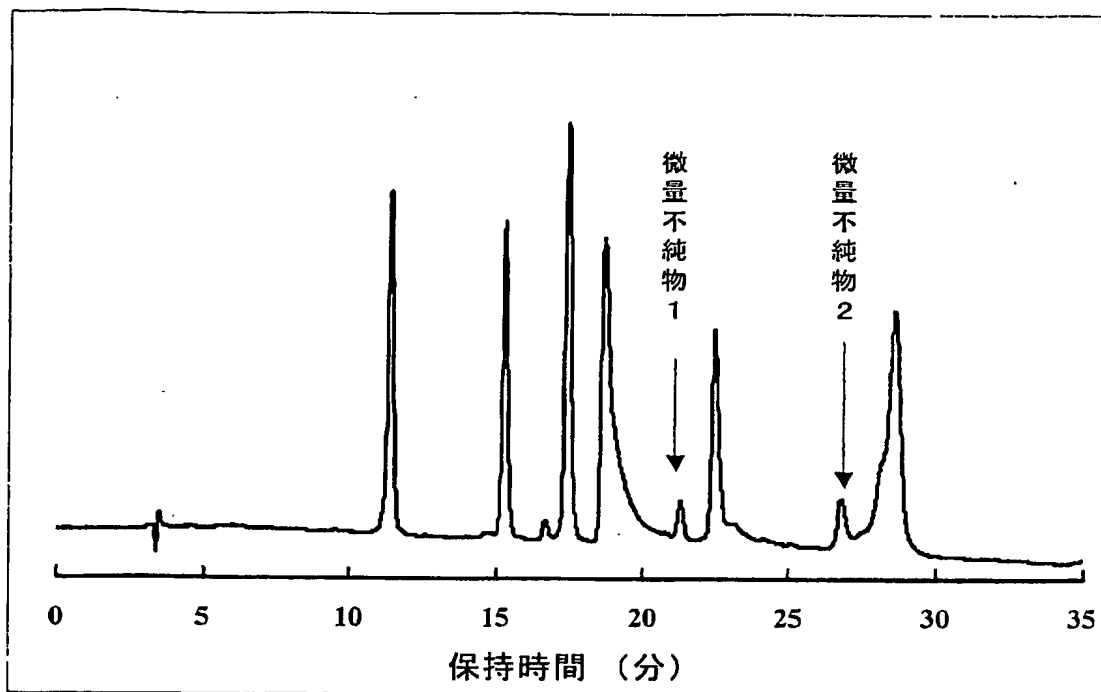
【0040】

【図1】実施例1で得られた液体クロマトグラフィー用充填剤を用いたタンパク質分離試験の液体クロマトグラフィーチャートである。

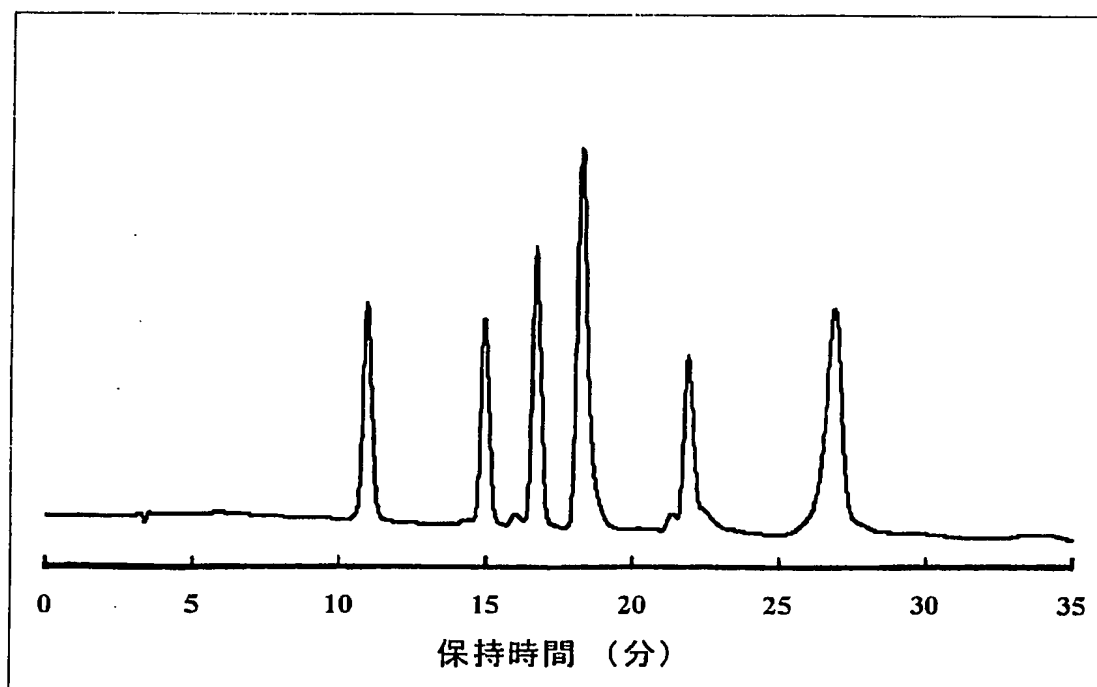
【図2】比較例1で得られた液体クロマトグラフィー用充填剤を用いたタンパク質分離試験の液体クロマトグラフィーチャートである。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



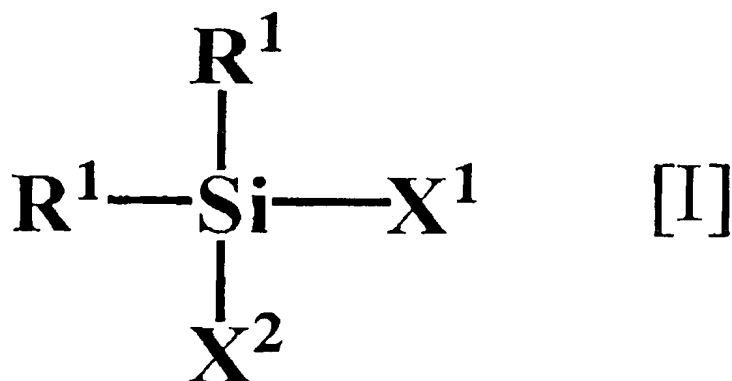
【書類名】要約書

【要約】

【課題】 耐酸性および耐アルカリ性に優れる高耐久性液体クロマトグラフィー用充填剤を提供する。

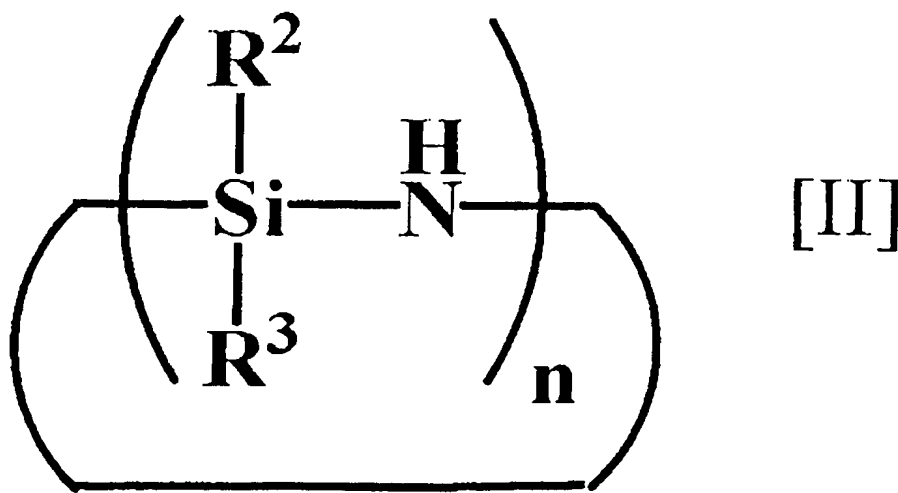
【解決手段】 シリカゲルに式 [I] で表される二官能性シラン化合物による化学修飾を行ったのち、式 [II] で表される二官能性環状シラザンを用いてエンドキャップ反応を行う。

【化1】



[式中、 X^1 および X^2 は水素原子、同一または異なるハロゲン原子もしくは炭素数 1～4 のアルコキシ基であり、 R^1 はアルキル基またはアリール基である。]

【化2】



[式中、 R^2 および R^3 は同一または異なる炭素数 1～4 のアルキル基である。また、 n は環を形成するユニットの係数で、2～10 の整数である。]

【選択図】 なし

特願 2 0 0 4 - 1 8 4 6 7 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 1 0 8 9 9 3]

1. 変更新月日 1 9 9 0 年 8 月 2 1 日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市西区江戸堀 1 丁目 1 0 番 8 号

氏 名 ダイソー株式会社